

抗 PD-1-抗 VEGFA 的双特异性抗体、其药物组合物及其用途

技术领域

- 5 本发明属于肿瘤治疗和免疫学生物学领域，涉及一种抗 PD-1-抗 VEGFA 的双特异性抗体、其药物组合及其用途。具体地，本发明涉及一种抗人 PD-1-抗人 VEGFA 的双特异性抗体、其药物组合及其用途。

背景技术

- 10 肿瘤尤其是恶性肿瘤是当今世界严重危害人类健康的疾病，在各种疾病所致死亡中高居第二位。而且近年来，其发病率呈明显上升趋势。恶性肿瘤治疗效果差，晚期转移率高，预后多不佳。目前临床上所采用的常规治疗方法如放、化疗和手术治疗虽然在很大程度上缓解了病痛，延长了生存时间，但这些方法均存在很大的局限性，其疗效难以进一步提高。

- 15 肿瘤的生长有两个明显不同的阶段，即从无血管的缓慢生长期转为有血管的快速增殖期，血管的生成使肿瘤能获得足够的营养而完成血管切换期，如果没有血管的生成，原发肿瘤的生长不超过 1—2mm，转移则无法实现。

- 血管内皮生长因子（VEGF）是一类能促进内皮细胞分裂增殖、促进新生血管的形成、提高血管通透性的生长因子，它与细胞表面的血管内皮生长因子受体结合，通过激活酪氨酸激酶信号转导途径发挥功能。在肿瘤组织中，肿瘤细胞、肿瘤侵入的巨噬细胞和肥大细胞能分泌高水平的 VEGF，以旁分泌的形式刺激肿瘤血管内皮细胞，促进内皮细胞增殖、迁移，诱导血管形成，促进肿瘤持续生长，并提高血管通透性，引起周围组织纤维蛋白沉着，促进单核细胞、成纤维细胞内皮细胞浸润，有利于肿瘤基质形成和肿瘤细胞进入新生血管，促进肿瘤转移，因而抑制肿瘤血管生成被认为是当前最具有前途的肿瘤治疗方法之一。VEGF 家族包括：VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD 和 PIGF。
- 20 血管内皮生长因子受体（VEGFR）包括 VEGFR1（又称 Flt1）、VEGFR2（又称 KDR 或 Flk1）、VEGFR3（又称 Flt4）和 Neuropilin-1（NRP-1）。其中，前三种受体在结构上类似，都属于酪氨酸激酶超家族，均由膜外区、跨膜片段及膜内区三部分构成，其中膜外区由免疫球蛋白样结构域组成，膜内区属酪氨酸激酶区。VEGFR1 和 VEGFR2 主要位于血管内皮细胞表面，VEGFR3 主要位于淋巴管内皮细胞表面。
- 25 30

VEGF 家族分子对于几种受体有不同的亲和力。VEGFA 主要与 VEGFR1、VEGFR2 和 NRP-1 结合发挥作用。VEGFR1 是最早发现的受体，在正常生理情况下 VEGFR1 与 VEGFA 的亲和力比 VEGFR2 与 VEGFA 的亲和力高，但是其胞内段酪氨酸酶活性比 VEGFR2 低（马莉，中国优生与遗传杂志，24（5）（2016）：146-148）。

5 VEGFR2 是血管发生和构建的主要调节者，与 VEGFR1 相比 VEGFR2 具有很高的酪氨酸激酶活性。VEGFR2 与配体 VEGFA 结合后介导血管内皮细胞的增殖、分化等行为，以及血管的形成过程和血管的通透性（Roskoski R Jr.等人，Crit Rev Oncol Hematol，62（3）（2007）：179-213.），VEGFA 与 VEGFR2 结合后通过下游 PLC- γ -PKC-Raf-MEK-MAPK 信号传导通路介导胞内相关蛋白基因转录表达，促进血管
10 内皮细胞增殖（Takahashi T 等人，Oncogene，18（13）（1999）：2221-2230.）。

VEGFR3 属于酪氨酸激酶家族成员之一，主要表达在胚胎时期的血管内皮细胞和成年期的淋巴管内皮细胞，VEGFC 和 VEGFD 与 VEGFR3 结合以刺激淋巴管内皮细胞的增殖与迁移，促进淋巴管的新生；NRP-1 是一种非酪氨酸激酶跨膜蛋白，不能独立转导生物信号，而与 VEGF 酪氨酸激酶受体形成复合物后才能介导信号传导。（马莉，中国
15 优生与遗传杂志，24（5）（2016）：146-148）。

VEGFA 与 VEGFR2 主要参与调控血管生成，VEGFA 与 VEGFR2 结合前后会引发上下游通路中众多中间信号形成级联反应，最终以内皮细胞增殖、存活、迁移、通透性增加及浸润到周围组织等不同形式改变其生理功能（董宏超等人，《现代肿瘤医学》，第 22 卷，第 9 期 2014 年 9 月，第 2231-3 页）。

20 目前已经有多种靶向人 VEGF 特别是 VEGFA 的人源化单克隆抗体，如贝伐单抗（Bevacizumab），其于 2004 年期间陆续被美国食品药品监督管理局批准用于治疗非小细胞肺癌、肾细胞癌、宫颈癌、转移性结直肠癌等多种肿瘤。

细胞程序性死亡受体-1（Programmed cell death protein, PD-1），又被称为 CD279，是 I 型跨膜糖蛋白膜表面受体，属于 CD28 免疫球蛋白超家族，普遍表达于 T 细胞，B
25 细胞以及髓样细胞。PD-1 有两个天然配体，PD-L1 和 PD-L2。PD-L1 和 PD-L2 均属于 B7 超家族，组成性地或诱导性地表达于多种细胞膜表面，包括非造血系统细胞以及多种肿瘤细胞。PD-L1 主要表达于 T 细胞、B 细胞、DC 以及微血管内皮细胞和多种肿瘤细胞。PD-L2 则仅表达于抗原呈递细胞如树突状细胞和巨噬细胞。PD-1 与其配体的相互作用可抑制淋巴的活化，抑制 T 细胞的增殖以及 IL-2、IFN- γ 等细胞因子的分泌。

30 有大量研究表明肿瘤微环境可保护肿瘤细胞免受免疫细胞的破坏，而肿瘤微环境中

浸润的淋巴细胞 PD-1 表达上调,且多种原发肿瘤组织在免疫组化分析中均表现为 PD-L1 阳性,如肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、结肠癌、胶质瘤等。同时,PD-L1 在肿瘤的表达与癌症患者的不良预后显著相关。阻断 PD-1 与其配体的相互作用可促进肿瘤特异性的 T 细胞免疫,提高肿瘤细胞的免疫清除效率。大量临床试验表明,靶向 PD-1 或 PD-L1 5 的抗体可促进 CD8⁺T 细胞浸润到肿瘤组织,上调抗肿瘤的免疫效应因子,如 IL-2、IFN- γ , 颗粒酶 B 以及穿孔素,从而有效抑制肿瘤的生长。

此外,抗 PD-1 的抗体还可用于治疗病毒慢性感染。病毒慢性感染往往伴随着病毒特异性的效应 T 细胞功能丧失和数量的减少。通过注射 PD-1 抗体可阻断 PD-1 和 PD-L1 的相互作用,从而有效抑制效应 T 细胞在病毒慢性感染中的耗竭。

10 由于 PD-1 抗体的广谱抗肿瘤前景和惊人的药效,业界普遍认为针对 PD-1 通路的抗体将带来治疗多种肿瘤治疗的突破性的进展:用于治疗非小细胞性肺癌,肾细胞癌,卵巢癌,黑色素瘤 (Homet M. B., Parisi G., et al., Anti-PD-1 Therapy in Melanoma. *Semin Oncol.* Jun;42(3) (2015):466-473), 淋巴瘤以及贫血(Held SA, Heine A, et al., *Advances in immunotherapy of chronic myeloid leukemia CML.* *Curr Cancer Drug Targets.* Sep;13(7) (2013):768-74)、微卫星高度不稳定性(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR) 15 肿瘤(多款抗 PD-1 抗体药物已受 FDA 等批注用于治疗具有 MSI-H/dMMR 特征的肿瘤)。

目前抗血管生成疗法和免疫检查点抑制剂的联用在很多肿瘤中展现出了良好的疗效。抗 VEGF 抗体,如 Bevacizumab,和 PD-1/PD-L1 抗体抗体的联用,如 Nivolumab、Pembrolizumab、Atezolizumab 等,在卵巢癌(Joyce F. Liu et al., *JAMA Oncol.* 2019;5(12):1731-1738.)、非小细胞肺癌(包括 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺 20 癌)(Manegold C, et al., *J Thorac Oncol.* 2017 Feb;12(2):194-207.)、肾细胞癌(Dudek AZ et al., *J Clin Oncol.* 2018;36 (suppl; abstr 4558).)、肝细胞癌(Stein S et al., *J Clin Oncol.* 2018, 36(15_suppl):4074.; FDA 于 2020 年批注 Bevacizumab 联合 Atezolizumab 治疗肝细胞癌)、直肠癌(包括 MSI-H/dMMR 和非 MSI-H/dMMR 类型)(Bendell JC 25 et al. Safety and efficacy of MPDL3280A (anti - PDL1) in combination with bevacizumab (bev) and/or FOLFOX in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). Presented at: American Society of Clinical Oncology; May 29–June 2, 2015; Chicago, IL. 2015; abstract 704; Hochster HS et al. Efficacy and safety of atezolizumab (atezo) and bevacizumab (bev) in a phase Ib study of microsatellite instability (MSI) - high 30 metastatic colorectal cancer (mCRC). Presented at: American Society of Clinical

- Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium; January 19–21, 2017; San Francisco, CA. 2017; abstract 673.)、乳腺癌 (Yukinori Ozaki et al., A multicenter phase II study evaluating the efficacy of nivolumab plus paclitaxel plus bevacizumab triple-combination therapy as a first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer: WJOG9917B NEWBEAT trial [abstract]. In: Proceedings of the 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2019 Dec 10-14; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2020;80(4 Suppl):Abstract nr PD1-03.) ; VEGFR2 抗体和 PD-1 抗体药物联用在胃及胃食管结合部腺癌亦展现了良好的抗肿瘤效果 (Herbst RS et al., Lancet Oncol. 2019;20(8):1109-1123.) ; PD-1 抗体 (Pembrolizumab) 和血管生成抑制剂 (Lenvatinib) 联用方案在治疗子宫内膜癌中展现出了良好的疗效, 于 2019 年被 FDA 批准用于治疗子宫内膜癌。对于黑色素瘤 (PD-1 抗体 Nivolumab 和 Pembrolizumab 已被 FDA 批准用于治疗黑色素瘤)、宫颈癌 (Krishnansu S. et al., N Engl J Med 2014; 370:734-743.)、胶质瘤、前列腺癌 (Antonarakis ES. et al., J Clin Oncol. 2020 Feb 10;38(5):395-405.)、尿路上皮癌 (Joaquim Bellmunt. et al., N Engl J Med 2017; 376:1015-1026; FDA 于 2017 年批注 Nivolumab 用于治疗膀胱癌)、食管癌 (Kato K et al., Lancet Oncol. 2019;20(11):1506–17.)、间皮瘤 (Scherpereel A et al., Lancet Oncol. 2019;20(2):239-253.) 等肿瘤, PD-1/PDL-1 抗体展现出了良好的疗效, 考虑到 PD-1 通路 与 VEGF 通路的在肿瘤发生中的协同作用, 可以预期同时阻断 PD-1 及 VEGF 通路的药 物将会有更好的抗肿瘤效果。
- 20 双功能抗体亦称为双特异性抗体 (Bispecific Antibody), 是同时靶向两种不同抗原 的特异性药物, 其可通过免疫分选纯化生产。另外, 也可通过基因工程获得, 基因工程 在结合位点优化, 合成形式的考量以及产量等方面都具有相应的灵活性, 所以具有一定的 优势。目前, 其存在形式已被证明有超过 45 种 (Müller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. BioDrugs 2010; 24:89-98)。
- 25 目前已开发的多种双特异性抗体为 IgG-ScFv 形式即 Morrison 模式 (Coloma M. J., Morrison S. L. Design and production of novel tetravalent bispecific antibodies. Nat Biotechnol., 1997;15:159-163), 由于这种类似于天然存在的 IgG 形式, 其在抗体工程、 表达和纯化上所具有的优势, 已被证明是双功能抗体的一种理想存在形式 (Miller B. R., Demarest S. J., et al., Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and
- 30 multivalent antibodies. Protein Eng Des Sel 2010; 23:549-57; Fitzgerald J, Lugovskoy A.

Rational engineering of antibody therapeutics targeting multiple oncogene pathways. MAbs 2011; 3:299-309)。

ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 即抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用, 是指抗体的 Fab 段结合病毒感染的细胞或肿瘤细胞的抗原表位, 其 Fc 段与杀伤细胞 (NK 细胞、巨噬细胞等) 表面的 Fc 受体 (Fc Receptor, FcR) 结合, 介导杀伤细胞直接杀伤靶细胞。

CDC (complement dependent cytotoxicity) 即补体依赖的细胞毒性, 是指当抗体与细胞膜表面相应抗原特异性结合后, 形成复合物而激活补体系统, 进而在靶细胞表面形成 MAC, 导致靶细胞溶解。补体能导致多种细菌和其他病原生物细胞的溶解, 是机体抵抗病原生物感染的重要防御机制。

Fc 受体是表达在特定免疫细胞表面, 用于识别抗体 Fc 区域介导免疫应答的免疫球蛋白家族蛋白。抗体 Fab 区域识别抗原后, 其抗体 Fc 区域与免疫细胞 (如杀伤细胞) 上的 Fc 受体结合, 启动免疫细胞的应答功能, 如吞噬作用及 ADCC。

根据 Fc 受体识别抗体类型及表达细胞的不同, Fc 受体主要分为 FcγR、FcαR 和 FcεR 三种类型, FcγR 又可分为 FcγRI (亦称为 CD64)、FcγRII (亦称为 CD32)、FcγRIII (亦称为 CD16) 和 FcRn (亦称为 Neonatal Fc receptor) 四种亚型。其中 FcγRI、FcγRII、FcγRIII 与 ADCC 效应密切相关。FcγRIII 是介导 ADCC 的最主要分子, 在不同细胞类型中具有高度同源的 FcγRIIIa 和 FcγRIIIb 两种亚型, 在 FcγRIIIa 人群中存在单核苷酸多态性 (SNP) 位点引起的高亲和力 FcγRIIIa 亚型, 分别称为 FcγRIIIa_V158 和低亲和力 FcγRIIIa_F158 两个亚型。FcγRI 对 IgG 的 Fc 区域具有较高的亲和力, 参与 ADCC 过程; FcγRII 有 FcγRIIa, FcγRIIb 和 FcγRIIc (亦分别称为 CD32a, CD32b, CD32c) 三个亚型, 其中 FcγRIIa 具有 ADCC 活性; FcγRIIa 在人群中存在由于单核苷酸突变导致的两种亚型, 分别称为 FcγRIIa_H131 和 FcγRIIa_R131 (Hogarth PM, Pietersz GA. 2012, NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, 11(4):311-331)。

IgG 家族包含四个成员, IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4, 它们重链恒定区的可结晶片段 (fragment crystallizable, Fc) 区域存在氨基酸的差异, 导致它们与 FcγRs 的亲和力各不相同。IgG1 是人体内最多的亚型, 也是单抗药物中用的最多的亚型, IgG1 能够结合各种 FcγRs, 能够引发 ADCC 以及 CDC 效应。IgG2 与 FcγRs 的亲和力最弱, 但是 IgG2 仍能够通过 FcγRIIIa 的结合引发单核细胞介导的 ADCC。IgG3 与 FcγRs 的结合能力最强, 能引发 ADCC, 且 CDC 效应比 IgG1 更强。IgG4 分子与 FcγRI 之外的 FcγRs 结合

较弱，IgG4 分子引起 CDC 和 NK 细胞介导的 ADCC 的可能性较低。

目前，尚需要开发新的抗 PD-1-抗 VEGFA 双特异性抗体，以减少或消除抗体介导的 ADCC 和/或 CDC 活性对抗 PD-1-抗 VEGFA 双特异性抗体所结合的免疫细胞造成的损伤，提高抗体药物药效。

5

发明内容

本发明人经过深入的研究和创造性的劳动，对抗 PD-1-抗 VEGFA 抗体结构的 Fc 端进行相应的改造，降低 Fc 区域与 Fc 受体的结合，从而降低对免疫细胞的 ADCC、CDC 毒副作用，增加抗 PD-1-抗 VEGFA 抗体药物的药物效能。

10 由此提供了下述发明：

本发明的一个方面涉及一种双特异性抗体，其包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

15 其中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者，所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白；

其中，

20 所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

25 所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型；

30 其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区在第 234 位点、235 位

点和 237 位点中的任意 2 个位点或 3 个位点发生突变，并且突变后，双特异性抗体与 FcγRIIIa 和/或 C1q 的亲和力常数相比突变前降低；优选地，所述亲和力常数通过 Fortebio Octet 分子相互作用仪测得。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变：

L234A 和 L235A；或者

L234A 和 G237A；或者

L235A 和 G237A；

或者

L234A、L235A、G237A。

本发明中，如果没有特别说明，位点之前的字母表示突变前的氨基酸，位点之后的字母表示突变后的氨基酸。

本发明还涉及一种双特异性抗体，其包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

其中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者，所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白；

其中，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型。

本发明还涉及一种双特异性抗体，其包括：

靶向 PD-1 的第一蛋白功能区，和

5 靶向 VEGFA 的第二蛋白功能区；

其中，所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白，所述第二蛋白功能区为单链抗体；或者，
所述第一蛋白功能区为单链抗体，所述第二蛋白功能区为免疫球蛋白；

其中，

所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 28—30 所示
10 的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 31—33 所示的
LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:
34—36 所示的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:
37—39 所示的 LCDR1—LCDR3；

或者，

15 所述的免疫球蛋白，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 34—36 所示
的 HCDR1—HCDR3 并且其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs: 37—39 所示
的 LCDR1—LCDR3；和所述的单链抗体，其重链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID
NOs: 28—30 所示的 HCDR1—HCDR3，其轻链可变区包含氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:
31—33 所示的 LCDR1—LCDR3；

20 所述免疫球蛋白为人 IgG1 亚型；

其中，按照 EU 编号系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有如下突变组合之一：

L234A 和 L235A；或者

L234A 和 G237A；或者

L235A 和 G237A；或者

25 L234A、L235A、G237A。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，按照 EU 编号
系统，所述免疫球蛋白的重链恒定区具有或还具有选自如下的一个或多个突变：

N297A、D265A、D270A、P238D、L328E、E233D、H268D、P271G、A330R、
30 C226S、C229S、E233P、P331S、S267E、L328F、A330L、M252Y、S254T、T256E、

N297Q、P238S、P238A、A327Q、A327G、P329A、K322A、T394D、G236R、G236A、L328R、A330S、P331S、H268A、E318A 和 K320A。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其中，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9；并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17；

或者，

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 5 和 SEQ ID NO: 9；并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11 和 SEQ ID NO: 17；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示；并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体，其选自如下的 (1) — (12) 中的任一项：

(1)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示；

(2)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示；

(3)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示；和，所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示；

(4)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示;

5 (5)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示;

10 (6)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示;

15 (7)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

20 (8)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

25 (9)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

30 (10)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示;

5 (11)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示; 以及

10 (12)

所述免疫球蛋白的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示, 并且所述免疫球蛋白的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 17 所示; 和, 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示, 并且所述单链抗体的轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

15 在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体:

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 所示, 并且其轻链的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 26 所示。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其为 IgG-scFv 形式即 Morrison 模式。

20 在本发明的一些实施方式中, 所述的在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

所述的免疫球蛋白, 其重链恒定区为人 Ig gamma-1 chain C region 或人 Ig gamma-4 chain C region, 并且其轻链恒定区为人 Ig kappa chain C region。

25 在本发明的一些实施方案中, 所述免疫球蛋白的恒定区是人源化的, 例如, 重链恒定区采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834; 或者

所述免疫球蛋白的重链恒定区采用 Ig gamma-4 chain C region, ACCESSION: P01861.1; 轻链恒定区采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

30 在本发明的一个实施方式中, 重链恒定区 Ig gamma-1 chain C region (ACCESSION: P01857) 的氨基酸序列如下:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
5 KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 40)

在本发明的一个实施方式中, 重链恒定区 Ig gamma-4 chain C region (ACCESSION: P01861.1) 的氨基酸序列如下:

10 ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSC
PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
15 PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK
(SEQ ID NO: 41)

在本发明的一个实施方式中, 轻链恒定区 Ig kappa chain C region (ACCESSION: P01834) 的氨基酸序列如下:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
20 QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 42)

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的 C 末端。由于免疫球蛋白由两条重链, 因此, 一个免疫球蛋白分子连接有两个单链抗体分子。优选地, 两个单链抗体分子相同。

25 在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述单链抗体为两条, 每条单链抗体的一端分别连接在免疫球蛋白的两条重链的 C 末端或 N 末端。

在本发明的一些实施方式中, 所述单链抗体的 V_H 与 V_L 之间存在二硫键。在抗体的 V_H 和 V_L 之间引入二硫键的方法是本领域熟知的, 例如可参见美国专利 US5,747,654; Rajagopal et. al, Prot. Engin. 10(1997)1453-1459; Reiter et. al, Nat. Biotechnol.
30 14(1996)1239-1245; Reiter et. al, Protein Engineering 8(1995)1323-1331; Webber et. al,

Molecular Immunology 32(1995)249-258; Reiter et. al, Immunity 2(1995)281-287; Reiter et. al, JBC 269(1994)18327-18331; Reiter et. al, Inter. J. of Cancer 58(1994)142-149; 或者 Reiter et. al, Cancer Res.54(1994)2714-2718; 其通过引用并入本文。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述第一蛋白
5 功能区与所述第二蛋白功能区直接连接或者通过连接片段连接; 和/或所述单链抗体的
重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区直接连接或者通过连接片段连接。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述连接片段
为(GGGGS) n , n 为正整数; 优选地, n 为1、2、3、4、5或6。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述第一蛋白
10 功能区和第二蛋白功能区独立地为1个、2个或者2个以上。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述单链抗体
连接在免疫球蛋白的重链的C末端。

本发明还涉及一种双特异性抗体, 其包括:

靶向PD-1的第一蛋白功能区, 和

15 靶向VEGFA的第二蛋白功能区;

所述第一蛋白功能区为1个, 所述第二蛋白功能区为2个;

其中, 所述第一蛋白功能区为免疫球蛋白, 所述第二蛋白功能区为单链抗体;

所述免疫球蛋白的重链的氨基酸序列如SEQ ID NO: 24所示, 并且其轻链的氨基
酸序列如SEQ ID NO: 26所示;

20 所述单链抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 9所示, 并且所述单链
抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 17所示;

所述单链抗体连接在免疫球蛋白的重链的C末端;

所述第一蛋白功能区与所述第二蛋白功能区通过第一连接片段连接; 并且所述单
链抗体的重链可变区与所述单链抗体的轻链可变区通过第二连接片段连接; 所述第一
25 连接片段和所述第二连接片段相同或不同;

优选地, 所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列独立地选自SEQ ID
NO: 18和SEQ ID NO: 19;

优选地, 所述第一连接片段和所述第二连接片段的氨基酸序列均如SEQ ID NO:
18所示。

30 在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述免疫球蛋

白或其抗原结合片段以小于大约 10^{-6} M, 例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更小的亲和力常数结合 **FcγRI**; 优选地, 所述亲和力常数通过 **Fortebio Octet** 分子相互作用仪测得。

在本发明的一个或多个实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述免疫球蛋白或其抗原结合片段以小于大约 10^{-9} M, 例如小于大约 10^{-7} M、 10^{-8} M 或 10^{-9} M 或更小的亲和力常数结合 **C1q**; 优选地, 所述亲和力常数通过 **Fortebio Octet** 分子相互作用仪测得。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中, 所述的双特异性抗体以小于 10^{-5} M, 例如小于 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的 K_D 结合 **VEGFA** 蛋白和/或 **PD-1** 蛋白; 优选地, 所述 K_D 通过 **Fortebio** 分子相互作用仪测得。

在本发明的一些实施方式中, 所述的双特异性抗体, 其中,

所述的双特异性抗体以小于 1 nM、小于 0.5 nM、小于 0.2 nM、小于 0.15 nM 或小于 0.14 nM 的 EC_{50} 结合 **VEGFA** 蛋白; 优选地, 所述 EC_{50} 通过间接 **ELISA** 方法测得; 和/或,

所述的双特异性抗体以小于 1 nM、小于 0.5 nM、小于 0.2 nM、小于 0.17 nM、小于 0.16 nM 或小于 0.15 nM 的 EC_{50} 结合 **PD-1** 蛋白; 优选地, 所述 EC_{50} 通过间接 **ELISA** 方法测得。

在本发明的一个或多个实施方案中, 所述双特异性抗体为单克隆抗体。

在本发明的一个或多个实施方案中, 所述双特异性抗体为人源化抗体。

20

本发明的再一方面涉及分离的核酸分子, 其编码本发明中任一项所述的双特异性抗体。

本发明的再一方面涉及一种载体, 其包含本发明的分离的核酸分子。

本发明的再一方面涉及一种宿主细胞, 其包含本发明的分离的核酸分子, 或者包含本发明所述的载体。

25

本发明的再一方面涉及偶联物, 其包括抗体或其抗原结合片段以及偶联部分, 其中, 所述免疫球蛋白为本发明中任一项所述的双特异性抗体, 所述偶联部分为可检测的标记; 优选地, 所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、发光物质、有色物质或酶。

30

本发明的再一方面涉及试剂盒，其包括本发明中任一项所述的双特异性抗体，或者包括本发明的偶联物；

- 优选地，所述试剂盒还包括第二抗体，其特异性识别所述免疫球蛋白或其抗原结合片段；任选地，所述第二抗体还包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光物质、
5 发光物质、有色物质或酶。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测 PD-1 和/或 VEGFA 在样品中的存在或其水平。

- 10 本发明的再一方面涉及一种药物组合物，其包含本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂。

- 本发明的双特异性抗体或者本发明的药物组合物可以配制成药学领域已知的任何剂型，例如，片剂、丸剂、混悬剂、乳剂、溶液、凝胶剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、酏剂、
15 锭剂、栓剂、注射剂（包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液）、吸入剂、喷雾剂等。优选剂型取决于预期的给药方式和治疗用途。本发明的药物组合物应当是无菌的并在生产和储存条件下稳定。一种优选的剂型是注射剂。此类注射剂可以是无菌注射溶液。例如，可通过下述方法来制备无菌注射溶液：在适当的溶剂中掺入必需剂量的本发明的双特异性抗体，以及任选地，同时掺入其他期望的成分(包括但不限于，pH 调节剂，
20 表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂，等渗剂、防腐剂、稀释剂，或其任何组合)，随后过滤除菌。此外，可以将无菌注射溶液制备为无菌冻干粉剂(例如，通过真空干燥或冷冻干燥)以便于储存和使用。此类无菌冻干粉剂可在使用前分散于合适的载体中，例如无菌无热原水。

- 此外，本发明的双特异性抗体可以以单位剂量形式存在于药物组合物中，以便于施
25 用。在某些实施方案中，所述单位剂量为至少 1mg，至少 5mg，至少 10mg，至少 15mg，至少 20mg，至少 25mg，至少 30mg，至少 45mg，至少 50mg，至少 75mg，或至少 100mg。在所述药物组合物为液体(例如，注射剂)剂型的情况下，其可以包含浓度至少为 0.1mg/ml，如至少 0.25mg/ml，至少 0.5mg/ml，至少 1mg/ml，至少 2.5mg/ml，至少 5mg/ml，至少 8mg/ml，至少 10mg/ml，至少 15mg/ml，至少 25mg/ml，至少 50mg/ml，至少 75mg/ml，
30 或至少 100mg/ml 的本发明的双特异性抗体。

本发明的双特异性抗体或药物组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法来施用，包括但不限于，口服、口腔、舌下、眼球、局部、肠胃外、直肠、叶鞘内、内胞浆网槽内、腹股沟、膀胱内、局部(如，粉剂、药膏或滴剂)，或鼻腔途径。但是，对于许多治疗用途而言，优选的给药途径/方式是胃肠外给药(例如静脉注射，皮下注射，腹膜内注射，
5 肌肉注射)。技术人员应理解，给药途径和/或方式将根据预期目的而发生变化。在一个优选的实施方案中，本发明的双特异性抗体或药物组合物通过静脉输注或注射给予。

本发明所提供的双特异性抗体或药物组合物可以单独使用或联合使用，也可以与另外的药学活性剂(例如肿瘤化疗药物)联合使用。这种另外的药学活性剂可以在施用本发明的双特异性抗体或本发明的药物组合物之前、同时或之后施用。

10 在本发明中，可调整给药方案以获得最佳目的反应(例如治疗或预防反应)。例如，可以单次给药，可以在一段时间内多次给药，或者可以随治疗情况的紧急程度按比例减少或增加剂量。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备治疗和/或预防恶性肿瘤的药物中的用途；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、
15 直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、食管癌、微卫星高度不稳定性(MSI-H)或错配修复缺陷(dMMR)癌、尿路上皮癌、间皮瘤、子宫内膜癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌和白血病；

20 优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；优选地，所述非小细胞性肺癌为EGFR和/或ALK敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

25 优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌。

本发明的再一方面涉及本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物在制备如下药物中的用途：

(1)

检测样品中的VEGFA水平的药物或试剂，

30 阻断VEGFA与VEGFR2结合的药物或试剂，

下调 VEGFA 的活性或其水平的药物或试剂，
解除 VEGFA 对血管内皮细胞增殖的刺激作用的药物或试剂，
抑制血管内皮细胞增殖的药物或试剂，或者
阻断肿瘤血管生成的药物或试剂；

5 和/或

(2)

阻断 PD-1 与 PD-L1 结合的药物或试剂，
下调 PD-1 的活性或其水平的药物或试剂，
解除 PD-1 对机体免疫抑制的药物或试剂，

10 促进 T 淋巴细胞中 IFN- γ 分泌的药物或试剂，或者
促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌的药物或试剂。

本发明的体外实验中，抗 VEGFA 抗体及抗 VEGFA-抗 PD-1 双特异性抗体均能抑制 HUVEC 细胞增殖，抗 PD-1 抗体及抗 VEGFA-抗 PD-1 双特异性抗体均能促进 IFN γ 和/或 IL-2 的分泌激活免疫反应。

15

本发明的再一方面涉及一种治疗和/或预防恶性肿瘤的方法，包括给予有需求的受试者以有效量的本发明中任一项所述的双特异性抗体或者本发明的偶联物的步骤；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、食管癌、微卫星高度不稳定性 (MSI-H) 或错配修复缺陷 (dMMR) 癌、尿路上皮癌、间皮瘤、子宫内膜癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌和白血病；

20

优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

25

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌。

30

本发明的双特异性抗体的治疗或预防有效量的典型非极限范围是 0.02—50mg/kg，例如 0.1—50mg/kg，0.1—25mg/kg，或 1—10mg/kg。应注意的是，剂量可随需要治疗的症状的类型和严重性不同而发生变化。此外，本领域技术人员理解，对于任一特定患者，

特定的给药方案应根据患者需要和医生的专业评价而随时间调整；此处给出的剂量范围只用于举例说明目的，而不限定本发明药物组合物的使用或范围。

在本发明中，所述受试者可以为哺乳动物，例如人。

本发明的再一方面涉及一种在体内或在体外的方法，其选自：

5 (1)

检测样品中的 VEGFA 水平的方法，

阻断 VEGFA 与 VEGFR2 结合的方法，

下调 VEGFA 的活性或其水平的方法，

解除 VEGFA 对血管内皮细胞增殖的刺激作用的方法，

10 抑制血管内皮细胞增殖的药物或试剂的方法，或者

阻断肿瘤血管生成的方法；

和/或

(2)

阻断 PD-1 与 PD-L1 结合的方法，

15 下调 PD-1 的活性或其水平的方法，

解除 PD-1 对机体免疫抑制的方法，

促进 T 淋巴细胞中 IFN- γ 分泌的方法，或者

促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌的方法。

20 在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体或者偶联物，其用于治疗/或预防恶性肿瘤；优选地，所述恶性肿瘤选自结肠癌、直肠癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌、胶质瘤、黑色素瘤、淋巴瘤、肾肿瘤、前列腺癌、膀胱癌、胃肠道癌、乳腺癌、脑癌、宫颈癌、食管癌、微卫星高度不稳定性 (MSI-H) 或错配修复缺陷 (dMMR) 癌、尿路上皮癌、间皮瘤、子宫内膜癌、胃腺癌、胃食管结合部腺癌和白血病；

25 优选地，所述肺癌为非小细胞性肺癌、小细胞肺癌；优选地，所述非小细胞性肺癌为 EGFR 和/或 ALK 敏感突变的非小细胞肺癌；

优选地，所述肝癌为肝细胞癌；

优选地，所述肾肿瘤为肾细胞癌；

优选地，所述乳腺癌为三阴性乳腺癌；

30 优选地，所述尿路上皮癌为膀胱癌。

在本发明的一个或多个实施方式中，所述的双特异性抗体或者偶联物，其用于：

(1)

检测样品中的 VEGFA 水平，

阻断 VEGFA 与 VEGFR2 结合，

5 下调 VEGFA 的活性或其水平，

解除 VEGFA 对血管内皮细胞增殖的刺激作用，

抑制血管内皮细胞增殖，或者

阻断肿瘤血管生成；

和/或

10 (2)

阻断 PD-1 与 PD-L1 结合，

下调 PD-1 的活性或其水平，

解除 PD-1 对机体免疫抑制，

促进 T 淋巴细胞中 IFN- γ 分泌，或者

15 促进 T 淋巴细胞中 IL-2 分泌。

抗体治疗药物，特别是单克隆抗体已在多种疾病的治疗中取得了良好的疗效。获取这些治疗性抗体的传统实验方法是采用抗原免疫动物，在免疫动物体内获取靶向抗原的抗体，或通过亲和力成熟的方法来改进那些与抗原的亲和力较低的抗体。

20 轻链和重链的可变区决定抗原的结合；每条链的可变区均含有三个高变区，称互补决定区(CDR)(重链(H Chain)的 CDR 包含 HCDR1、HCDR2、HCDR3，轻链(L Chain)的 CDR 包含 LCDR1、LCDR2、LCDR3；其由 Kabat 等人命名，见 Bethesda M.d., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition ,NIH Publication (1-3) 1991: 91-3242.

25 优选地，CDR 也可以由 IMGT 编号系统定义，请参见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 38.suppl_1 (2009): D301-D307。

30 通过本领域技术人员所熟知的技术手段，例如通过 VBASE2 数据库根据 IMGT 定义分析下面的 (1) - (13) 项中的单克隆抗体序列的 CDR 区的氨基酸序列，结果如下：

(1) Bevacizumab

重链可变区的氨基酸序如 SEQ ID NO: 1 所示, 轻链可变区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示。

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

5 HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 28)
HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 29)
HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 30)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 31)
10 LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 32)
LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 33)

(2) 14C12、14C12H1L1 或 14C12H1L1(M)

其重链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

HCDR1: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 34)
15 HCDR2: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 35)
HCDR3: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 36)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

LCDR1: QDINTY (SEQ ID NO: 37)
LCDR2: RAN (SEQ ID NO: 38)
20 LCDR3: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 39)

(3) VP101(hG1WT)或 VP101(hG1DM)

其重链的 9 个 CDR 区的氨基酸序列如下:

HCDR1: GYTFTNYG (SEQ ID NO: 28)
HCDR2: INTYTGEP (SEQ ID NO: 29)
25 HCDR3: AKYPHYYGSSHWYFDV (SEQ ID NO: 30)
HCDR4: GFAFSSYD (SEQ ID NO: 34)
HCDR5: ISGGGRYT (SEQ ID NO: 35)
HCDR6: ANRYGEAWFAY (SEQ ID NO: 36)
HCDR7: QDINTY (SEQ ID NO: 37)
30 HCDR8: RAN (SEQ ID NO: 38)

HCDR9: LQYDEFPLT (SEQ ID NO: 39)

其轻链可变区的 3 个 CDR 区的氨基酸序列如下：

LCDR1: QDISNY (SEQ ID NO: 31)

LCDR2: FTS (SEQ ID NO: 32)

5 **LCDR3: QQYSTVPWT (SEQ ID NO: 33)。**

本发明的抗体 VP101(hG1DM)在 VP101(hG1WT)非可变区引入氨基酸突变。按照 EU 编号系统在 234、235 位点引入氨基酸突变：

通过在其重链铰链区域第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变(L234A)，
10 第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L235A)，获得 VP101 (hG1DM)。

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的细胞培养、分子遗传学、核酸化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，
15 下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，当提及 VEGFA 蛋白 (GenBank ID: NP_001165097.1) 的氨基酸序列时，其包括 VEGFA 蛋白的全长，还包括 VEGFA 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段 (mFc 或 hFc) 进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在
20 VEGFA 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换，缺失和/或添加)，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“VEGFA 蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述 VEGFA 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。在本发明的一个实施方案中，VEGFA 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 33 的下划线部分所示 (不含末尾的 6 个 His，共 302
25 个氨基酸)。

如本文中所使用的，当提及 VEGFR2 蛋白 (亦称为 KDR, GenBank ID: NP_002244) 的氨基酸序列时，其包括 VEGFR2 蛋白的全长，或者 VEGFR2 的胞外片段 VEGFR2-ECD 或者包含 VEGFR2-ECD 的片段；还包括 VEGFR2-ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段 (mFc 或 hFc) 进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在
30 VEGFR2 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异 (包括但不限于置换、

缺失和/或添加)，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“VEGFR2 蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述 VEGFR2 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。在本发明的一个实施方案中，VEGFR2 的胞外片段 VEGFR2-ECD 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 34 所示（766 个氨基酸）。

如本文中所使用的，如果没有特别说明，所述 VEGFR 为 VEGFR1 和/或 VEGFR2；其具体蛋白序列为现有技术中已知序列，可以参考现有文献或者 GenBank 中公开的序列。例如，VEGFR1（VEGFR1, NCBI Gene ID: 2321）；VEGFR2（VEGFR2, NCBI Gene ID: 3791）。

如本文中所使用的，当提及 PD-1 蛋白（Programmed cell death protein 1, NCBI GenBank: NM_005018）的氨基酸序列时，其包括 PD-1 蛋白的全长，或者 PD-1 的胞外片段 PD-1ECD 或者包含 PD-1ECD 的片段；还包括 PD-1ECD 的融合蛋白，例如与小鼠或人 IgG 的 Fc 蛋白片段（mFc 或 hFc）进行融合的片段。然而，本领域技术人员理解，在 PD-1 蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异（包括但不限于置换，缺失和/或添加），而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“PD-1 蛋白”应包括所有此类序列，包括其天然或人工的变体。并且，当描述 PD-1 蛋白的序列片段时，其还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。

如本文中所使用的，术语 EC_{50} 是指半最大效应浓度（concentration for 50% of maximal effect），是指能引起 50% 最大效应的浓度。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，是指通常由两对多肽链（每对具有一条“轻”（L）链和一条“重”（H）链）组成的免疫球蛋白分子。从一般意义上，重链可以理解为抗体中分子量较大的多肽链，轻链是指抗体中分子量较小的多肽链。轻链可分类为 κ 和 λ 轻链。重链通常可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区（ V_H ）和重链恒定区（ C_H ）组成。重链恒定区由 3 个结构域（ C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} ）组成。各轻链由轻链可变区（ V_L ）和轻链恒定区（ C_L ）组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（例如，效应细胞）和经典补系统的第一组分（C1q）的结合。 V_H 和 V_L 区还可被细分为具有高变性的区域（称为互补决定区（CDR）），其间散布有较保守的称为构架区（FR）的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：

FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(V_H 和 V_L)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配可以遵循 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), 或者 Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196(1987):901-917; Chothia et al. Nature 342(1989): 878-883 或者 IMGT 编号系统定义, 见 Ehrenmann, Francois, Quentin Kaas, and Marie-Paule Lefranc. "IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhcSF." Nucleic acids research 38.suppl_1 (2009): D301-D307.的定义。特别地, 重链还可以包含 3 个以上 CDR, 例如 6、9、或 12 个。例如在本发明的双特异性抗体中, 重链可以是 IgG 抗体的重链的 C 端连接另一个抗体的 ScFv, 这种情况下重链含有 9 个 CDR。术语“抗体”不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如, 其包括, 特别地, 重组抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。抗体可以是不同同种型的抗体, 例如, IgG (例如, IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 抗体。

如本文中所使用的, 术语抗体的“抗原结合片段”是指包含全长抗体的片段的多肽, 其保持特异性结合全长抗体所结合的相同抗原的能力, 和/或与全长抗体竞争对抗原的特异性结合, 其也被称为“抗原结合部分”。通常参见, Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)。可通过重组 DNA 技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂方法产生抗体的抗原结合片段。在一些情况下, 抗原结合片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb 和互补决定区(CDR)片段、单链抗体 (例如, scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和具有足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分的多肽。

如本文中所使用的, 术语“Fd 片段”意指由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段; 术语“Fv 片段”意指由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的抗体片段; 术语“dAb 片段”意指由 V_H 结构域组成的抗体片段(Ward 等人, Nature 341 (1989):544-546); 术语“Fab 片段”意指由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的抗体片段; 术语“F(ab')₂ 片段”意指包含通过铰链区上的二硫桥连接的两个 Fab 片段的抗体片段。

在一些情况下, 抗体的抗原结合片段是单链抗体(例如, scFv), 其中 V_L 和 V_H 结构域通过使其能够产生为单个多肽链的连接体配对形成单价分子(参见, 例如, Bird 等人, Science 242 (1988):423-426 和 Huston 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85

(1988):5879-5883)。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH₂-V_L-接头-V_H-COOH 或 NH₂-V_H-接头-V_L-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)₄ 的接头，但也可使用其变体(Holliger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993): 6444-6448)。可用于本发明的其他接头由 Alfthan et al.,
5 *Protein Eng.* 8 (1995):725-731, Choi et al., *Eur. J. Immunol.* 31 (2001): 94-106, Hu et al., *Cancer Res.* 56 (1996):3055-3061, Kipriyanov et al., *J. Mol. Biol.* 293 (1999):41-56 和 Roovers et al., *Cancer Immunol.* (2001)描述。

在一些情况下，抗体的抗原结合片段是双抗体，即，双价抗体，其中 V_H 和 V_L 结构域在单个多肽链上表达，但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配
10 对，从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见，例如，Holliger P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993):6444-6448, 和 Poljak R. J. et al., *Structure* 2 (1994):1121-1123)。

可使用本领域技术人员已知的常规技术(例如，重组 DNA 技术或酶促或化学断裂法)从给定的抗体获得抗体的抗原结合片段(例如，上述抗体片段)，并且以与用于完整抗
15 体的方式相同的方式就特异性筛选抗体的抗原结合片段。

在本文中，除非上下文明确指出，否则当提及术语“抗体”时，其不仅包括完整抗体，而且包括抗体的抗原结合片段。

如本文中所使用的，术语“单抗”和“单克隆抗体”是指，来自一群高度同源的抗体分子中的一个抗体或抗体的一个片断，也即除可能自发出现的自然突变外，一群完全相同
20 的抗体分子。单抗对抗原上的单一表位具有高特异性。多克隆抗体是相对于单克隆抗体而言的，其通常包含至少 2 种或更多种的不同抗体，这些不同的抗体通常识别抗原上的不同表位。单克隆抗体通常可采用 Kohler 等首次报道的杂交瘤技术获得 (*Nature*, 256:495,1975)，但也可采用重组 DNA 技术获得(如参见 U.S. Patent 4,816,567)。

如本文中所使用的，术语“嵌合抗体”是指这样的抗体，其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类)，而轻链或/和重
25 链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类)，但无论如何，其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S. Patent 4,816,567 Cabilly et al.; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984):6851-6855)。

如本文中所使用的，术语“人源化抗体”是指，人源免疫球蛋白(受体抗体)的全部
30 或部分 CDR 区被一非人源抗体(供体抗体)的 CDR 区替换后得到的抗体或抗体片段，

其中的供体抗体可以是具有预期特异性、亲和性或反应性的非人源（例如，小鼠、大鼠或兔）抗体。此外，受体抗体的构架区（FR）的一些氨基酸残基也可被相应的非人源抗体的氨基酸残基替换，或被其他抗体的氨基酸残基替换，以进一步完善或优化抗体的性能。关于人源化抗体的更多详细内容，可参见例如，Jones et al., *Nature*, 321 (1986):522-525; Reichmann et al., *Nature*, (1988) 332:323-329; Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2 (1992):593-596;和 Clark, *Immunol. Today* 21 (2000): 397-402。

如本文中所使用的，术语“表位”是指，抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如，表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸，其可以是“线性的”或“构象的”。参见，例如，*Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*，第 66 卷，G. E. Morris, Ed. (1996)。在线性表位中，蛋白质与相互作用分子（例如抗体）之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中，相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的，术语“载体（vector）”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体（YAC）、细菌人工染色体（BAC）或 P1 来源的人工染色体（PAC）；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增

强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa
5 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异性的抗体）是指，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力 (K_D) 结合该抗原。在本发明的一些实施方案
10 中，术语“靶向”是指特异性结合。

如本文中所使用的，术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数，其用于描述抗体与抗原之间的结合亲和力。平衡解离常数越小，抗体-抗原结合越紧密，抗体与抗原之间的亲和力越高。通常，抗体以小于大约 10^{-5} M，例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的解离平衡常数 (K_D) 结合抗原，例如，如使用表面等
15 离子体共振术 (SPR) 在 BIACORE 仪中测定或 Fortebio 分子相互作用仪中测定的。

如本文中所使用的，术语“单克隆抗体”和“单抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多克隆抗体”和“多抗”具有相同的含义且可互换使用；术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中，氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如，丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的，术语“药学上可接受的辅料”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性成分相容的载体和/或赋形剂，其是本领域公知的（参见例如 Remington's
20 Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995），并且包括但不限于：pH 调节剂，表面活性剂，佐剂，离子强度增强剂。例如，pH 调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液；表面活性剂包括但不限于
25 阳离子，阴离子或者非离子型表面活性剂，例如 Tween-80；离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

如本文中所使用的，术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂，当其与抗原一起或预先递送入机体时，其可增强机体对抗原的免疫应答或改变免疫应答类型。佐剂有很多种，包括但不限于铝佐剂（例如氢氧化铝）、弗氏佐剂（例如完全弗氏佐剂和不完全弗氏佐
30 剂）、短小棒状杆菌、脂多糖、细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物试验中最常用的佐剂。

氢氧化铝佐剂则在临床实验中使用较多。

如本文中所使用的，术语“有效量”是指足以获得或至少部分获得期望的效果的量。例如，预防疾病（例如 PD-1 与 PD-L1 结合或者 VEGF 表达过高相关的疾病如肿瘤）有效量是指，足以预防，阻止，或延迟疾病（例如 PD-1 与 PD-L1 结合或者 VEGF 表达过高相关的疾病如肿瘤）的发生的量；治疗疾病有效量是指，足以治愈或至少部分阻止已患有疾病的患者的疾病和其并发症的量。测定这样的有效量完全在本领域技术人员的能力范围之内。例如，对于治疗用途有效的量将取决于待治疗的疾病的严重度、患者自己的免疫系统的总体状态、患者的一般情况例如年龄，体重和性别，药物的施用方式，以及同时施用的其他治疗等等。

术语“MSI (microsatellite instability)”是微卫星不稳定性。微卫星 (Microsatellite) 是遍布于人类基因组中的短串联重复序列，有单核苷酸、双核苷酸或高位核苷酸的重复，重复次数 10-50 次。与正常细胞相比，某些异常组织细胞，如肿瘤，内的微卫星由于重复单位的插入或缺失而导致微卫星长度的改变，就叫做 MSI。根据 MSI 不稳定性和程度，可分为微卫星高度不稳定型 (MSI-H)、微卫星低度不稳定型 (MSI-L) 和微卫星稳定型 (MSS)。造成 MSI 的主要原因是 DNA 错配修复 (mismatch repair, MMR) 功能缺陷。人类错配修复基因 (MMR 基因) 经转录翻译后可表达相应的错配修复蛋白，如果任一 MMR 蛋白表达缺失可造成细胞的错配修复功能缺陷，则对 DNA 复制过程中的碱基错配丧失修复功能而造成累积，导致微卫星不稳定 (MSI) 的发生，约 15% 的结直肠癌是经由 MSI 途径引发的。最早发现于结直肠癌，也可发生于胃癌、子宫内膜癌、肾上腺皮质肿瘤等 (Baretti M 等人, Pharmacol Ther. 2018;189:45 - 62.)，后续研究在间皮瘤、肉瘤、肾上腺皮质癌、恶性黑色素瘤和卵巢生殖细胞肿瘤中亦发现 MSI-H/dMMR 特征。

MSI-H 和 dMMR 代表两种不同检测方法所产生的结果，dMMR 与 MSI-H 在生物学上具有一致性，称为 MSI-H/dMMR 或者 MSI-high/dMMR，MSI-L 和 MSS 则是 MMR 正常 (proficient mismatch repair, pMMR) 的表型。dMMR 检测方法为基于肿瘤标本 (包括手术标本、穿刺标本) 进行 MSH2、MLH1、MSH6 以及 PMS2 四个错配基因的免疫组化蛋白检测，若四个蛋白里面任何一个蛋白表达缺失则为 dMMR；如四个蛋白均为阳性表达则肿瘤为 pMMR，即错配修复功能完整。MSI 的检测为肿瘤细胞和体细胞重复 DNA 序列 (微卫星序列) 的长度进行一一配对检测，并比较长度。当使用 PCR 方法并基于美国 NCI 标准检测 5 个标准位点时，如果其中有两个或两个以上位点不一致

则为不稳定, 定义为 MSI-H, 如果一个位点不一致则称为 MSI-L (微卫星低度不稳定), 如 5 个位点均一致则为 MSS。高通量测序 (High-throughput sequencing) (或称下一代测序, Next-generation sequencing technology, NGS) 亦可作为检测微卫星不稳定性的方法。当选用更多的微卫星位点, 如多于 5 个或者其他一些微卫星位点, 进行 PCR 检测
5 时, 通常 $\geq 30\%$ 的位点不一致就叫 MSI-H, 所有位点都一致就定义为 MSS, 在 0 到 30% 之间是 MSI-L。

发明的有益效果

本发明实现了如下的 (1) 至 (4) 项中所述技术效果中的任意一项或者任意多项:

10 (1) 本发明对抗体 Fc 端的改造完全消除了 VP101(hG1WT)与 Fc 受体 Fc γ RI、Fc γ RIIIa_F158 的结合活性, 进而完全的消除了 ADCC 活性。

(2) 本发明对抗体 Fc 端的改造完全消除了 VP101(hG1WT)与补体 C1q 的结合活性, 进而完全地消除了 CDC 活性。

15 (3) 本发明的双特异性抗体能够很好地特异性与 VEGFA 结合, 并且能够十分有效地阻断 VEGFA 与 VEGFR2 的结合, 特异地解除 VEGFA 对机体免疫抑制以及对血管形成的促进作用。

(4) 本发明的双特异性抗体能够很好地与 PD-1 特异性结合, 并且能够十分有效地阻断 PD-1 与 PD-L1 的结合, 特异地解除 PD-1 对机体免疫抑制, 激活免疫反应。

20 附图说明

图 1: VP101(hG1DM)与 Fc γ RI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

图 2: Bevacizumab 与 Fc γ RI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

25 图 3: Nivolumab 与 Fc γ RI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

图 4: VP101(hG1WT)与 Fc γ RI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

30 图 5: VP101(hG4WT)与 Fc γ RI 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 50nM、25nM、12.5nM、6.25nM、3.12nM。

图 6: VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 7: Bevacizumab 与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

5 图 8: Nivolumab 与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 9: VP101(hG1WT)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

10 图 10: VP101(hG4WT)与 FcγRIIa_H131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 11: VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 12: Bevacizumab 与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

15 图 13: Nivolumab 与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 14: VP101(hG1WT)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

20 图 15: VP101(hG4WT)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 200nM、100nM、50nM、25nM、12.5nM。

图 16: VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 17: Bevacizumab 与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

25 图 18: Nivolumab 与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 19: VP101(hG1WT)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

30 图 20: VP101(hG4WT)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 21: VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗原的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 22: Bevacizumab 与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

5 图 23: Nivolumab 与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 24: VP101(hG1WT)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

10 图 25: VP101(hG4WT)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 500nM、250nM、125nM、62.5nM、31.25nM。

图 26: VP101(hG1DM)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 27: Bevacizumab 与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

15 图 28: Nivolumab 与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 29: VP101(hG1WT)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗体的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

20 图 30: VP101(hG4WT)与 C1q 的亲和力常数检测结果图。图中从上到下的每对曲线中加入抗原的浓度分别为 10nM、5nM、2.5nM、1.25nM、0.625nM。

图 31: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)在表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 靶细胞体系的 ADCC 活性检测结果。

图 32: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)在表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 靶细胞体系的 CDC 活性检测结果。

25 图 33: ELISA 法检测抗体 VP101(hG1DM)对 PBMC、Raji-PDL1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IFN-γ 的分泌的影响。

图 34: ELISA 法检测抗体 VP101(hG1DM)对 PBMC、Raji-PDL1 细胞混合培养所诱导的细胞因子 IL-2 的分泌的影响。

30 图 35: VP101(hG1DM)在表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 靶细胞体系的 ADCP 活性检测结果。

具体实施方式

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述。本领域技术人员将会理解，下面的实施例仅用于说明本发明，而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者，按照本领域内的文献所描述的技术或条件（例如参考 J. 萨姆布鲁克等著，黄培堂等译的《分子克隆实验指南》，第三版，科学出版社）或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市场购买获得的常规产品。

在本发明的下述实施例中，所用的同靶点已上市药物抗体 **Bevacizumab**（商品名 **Avastin®**）作为对照抗体，购自豪夫迈·罗氏有限公司 **Roche**，或者也可以参照制备例 1 进行制备。

在本发明的下述实施例中，所用的同靶点已上市药物抗体 **Nivolumab**（商品名 **Opdivo®**）作为对照抗体，购自百时美施贵宝公司 **BMS**。

在本发明的下述实施例中，所用同型对照抗体为人抗鸡蛋溶酶体（**human anti-Hen Egg Lysozyme IgG, anti-HEL**，即 **human IgG**，简称 **hIgG**），其可变区序列来自于 **Acierno** 等人发表的 **Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies**（**Acierno** 等人，**J Mol Biol.** 2007; 374(1): 130-46.。实施例中所用到的 **hIgG1DM** 和 **hIgG4WT** 即是 **anti-HEL** 带有 **hG1DM** 和 **hG4WT** 恒定区序列的同型对照抗体，在中山康方生物医药有限公司实验室制备而成。

20

制备例 1：抗 VEGFA 的抗体 **Bevacizumab** 的制备

上市的抗 VEGFA 单抗 **Avastin**（**Bevacizumab**）的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列参照中国专利公开 **CN1259962A**。编码重链可变区和轻链可变区的核酸序列委托金斯瑞公司合成。

25 **Bevacizumab** 重链可变区（**Bevacizumab-Hv**）的氨基酸序列：（123 aa）

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGW
INTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSS
HWYFDVWGQGTLVTVSS（SEQ ID NO: 1）

编码 **Bevacizumab** 重链可变区的核酸序列：（369 bp）

30 **GAGGTGCAGCTGGTCCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGGCGGGT**

CTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAACTATGGAATG
 AATTGGGTGCGCCAGGCACCAAGGAAAGGGACTGGAGTGGGTTCGGCTGGATCA
 AACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCCGACTTTAAGCGGCGGTTCACC
 TTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACTGCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCG
 5 AGCTGAGGACACCGCAGTCTACTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGA
 GCAGCCATTGGTATTTTGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAG
 CAGC (SEQ ID NO: 2)

Bevacizumab 轻链可变区 (Bvacizumab-Lv) 的氨基酸序列: (107 aa)

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSL
 HSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIK (SEQ
 ID NO: 3)

编码 Bevacizumab 轻链可变区的核酸序列: (321 bp)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTGGGCGA
 15 CAGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAACCTACCTGAATT
 GGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTGATCTACTTCACTAGC
 TCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGCGGATCCGGATCTGGAACCG
 ACTTTACTCTGACCATTTCTAGTCTGCAGCCTGAGGATTTTCGCTACATACTATT
 GCCAGCAGTATTCTACCGTGCCATGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGA
 20 GATCAAG (SEQ ID NO: 4)

重链恒定区均采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857; 轻链恒定区
 均采用 Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834。

将 Bevacizumab 的重链 cDNA 和轻链的 cDNA 分别克隆到 pcDNA3.1 载体中, 获得
 抗体 Bevacizumab 的重组表达质粒。将重组质粒转染 293F 细胞。将 293F 细胞培养液纯
 25 化后进行检测。

制得了抗 VEGFA 单抗 Avastin (Bvacizumab)。

制备例 2: 抗 PD-1 的抗体 14C12、其人源化抗体 14C12H1L1 以及突变体
 14C12H1L1(M)的序列设计

30 抗 PD-1 的抗体 14C12 及其人源化抗体 14C12H1L1 的重链和轻链的氨基酸序列、

以及编码核酸序列分别与中国专利公开 CN 106967172A 中的 14C12、14C12H1L1 相同。

(1) 14C12 的重链可变区序列和轻链可变区序列

14C12 的重链可变区的氨基酸序列: (118 aa)

5 EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFAFSSYDMSWVRQTPEKRLEWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSEDALYYCANRYGEAW
FAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 5)

编码 14C12 的重链可变区的核酸序列: (354 bp)

GAGGTCAAACCTGGTGGAGAGCGGCGGGCTGGTGAAGCCCCGGCGG
10 GTCACCTGAAACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCGCCTTTAGCTCCTACGAC
ATGTCATGGGTGAGGCAGACCCCTGAGAAGCGCCTGGAATGGGTCGCTACT
ATCAGCGGAGGCGGGCGATACACCTACTATCCTGACTCTGTCAAAGGGAGA
TTCACAATTAGTCGGGATAACGCCAGAAATACTCTGTATCTGCAGATGTCTA
GTCTGCGGTCCGAGGATACAGCTCTGTACTATTGTGCAAACCGGTACGGCG
15 AAGCATGGTTTGCCTATTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACAGTCTCTGCC
(SEQ ID NO: 6)

14C12 的轻链可变区的氨基酸序列: (107 aa)

DIKMTQSPSSMYASLGERTVFTCKASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
20 NRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLEL
K (SEQ ID NO: 7)

编码 14C12 的轻链可变区的核酸序列: (321 bp)

GACATTAAGATGACACAGTCCCCTTCCTCAATGTACGCTAGCCTGGGCG
AGCGAGTGACCTTCACATGCAAAGCATCCCAGGACATCAACACATACCTGTC
25 TTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGCAAAAGCCCCAAGACCCTGATCTACCGGGC
CAATAGACTGGTGGACGGGGTCCCCAGCAGATTCTCCGGATCTGGCAGTGG
GCAGGATTACTCCCTGACCATCAGCTCCCTGGAGTATGAAGACATGGGCATC
TACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCTCTGACCTTTGGAGCAGGCACAA
AACTGGAAGTGAAG (SEQ ID NO: 8)

(2) 人源化单克隆抗体 14C12H1L1 的重链可变区序列和轻链可变区序列、重链序列和轻链序列

14C12H1L1 重链可变区的氨基酸序列：(118 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVA
5 TISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGE
AWFAYWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 9)

编码 14C12H1L1 重链可变区的核酸序列：(354 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGG
GTCAGTGCAGCTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTCGCCTTTAGCTCCTACGA
10 CATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTA
CTATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCC
GGTTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGA
ACAGCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACG
GGGAAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCCTGGTGACAGTCTCTA
15 GT (SEQ ID NO: 10)

14C12H1L1 轻链可变区的氨基酸序列：(107 aa)

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRA
NRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLE
20 LK (SEQ ID NO: 11)

编码 14C12H1L1 轻链可变区的核酸序列：(321 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGC
GACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTG
AGCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGG
25 GCTAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGC
GGACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCA
ACCTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGG
ACAAAACCTGGAGCTGAAG (SEQ ID NO: 12)

30 14C12H1L1 重链 (14C12H1) 的氨基酸序列：(448 aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKGLDWVAT
ISGGGRYTYYPDSVKGRFTISRDN SKNNLYLQMNSLRAEDTALYYCANRYGEA
WFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
5 DKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)

10 编码 14C12H1L1 重链 (14C12H1) 的核酸序列: (1344 bp)

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGGGGAGGGCTGGTGCAGCCCGGCGG
GTCACTGCGACTGAGCTGCGCAGCTTCCGGATTTCGCCTTTAGCTCCTACGAC
ATGTCCTGGGTGCGACAGGCACCAAGGAAAGGGACTGGATTGGGTGCTACT
ATCTCAGGAGGCGGGAGATACACCTACTATCCTGACAGCGTCAAGGGCCGG
15 TTCACAATCTCTAGAGATAACAGTAAGAACAATCTGTATCTGCAGATGAACA
GCCTGAGGGCTGAGGACACCGCACTGTACTATTGTGCCAACCGCTACGGGG
AAGCATGGTTTGCCTATTGGGGGCAGGGAACCTGGTGACAGTCTCTAGTG
CCAGCACCAAAGGACCTAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCAC
CAGCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTGA
20 ACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTCCATAC
ATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCCAGCGTCGTC
ACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGTAACGTCAAC
CACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTGGAGCCCAAATCCTGC
GACAAGACACACCTGTCCCCCTGTCTGCTCCCGAACTCCTCGGAGGCC
25 CTAGCGTCTTCTCTTTCTCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCAGCAG
AACCCTGAAGTCACCTGTGTCGTCGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGA
GGTGAAATTCAACTGGTATGTCGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAAC
CAAGCCCAGGGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCT
GACAGTCCTCCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT
30 GTCCAACAAGGCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAA

AGGCCAACCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGA
ACTCACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAACTAC
AAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTGTACAGCA
5 AGCTGACCGTGGACAAAAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTGTTCTCCTGCA
GCGTGATGCACGAAGCCCTCCACAACCACTACACCCAGAAAAGCCTGTCCCT
GAGCCCCGGCAAA (SEQ ID NO: 14)

14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 的氨基酸序列: (214 aa)

10 DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFPCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTLIYRAN
RLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC
(SEQ ID NO: 15)

15 编码 14C12H1L1 轻链 (14C12L1) 的核酸序列: (642 bp)

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCCTCCTCCATGTCCGCCTCTGTGGGCG
ACAGGGTCACCTTCACATGCCGCGCTAGTCAGGATATCAACACCTACCTGAG
CTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAAGCCCCAAGACACTGATCTACCGGGC
TAATAGACTGGTGTCTGGAGTCCCAAGTCGGTTCAGTGGCTCAGGGAGCGG
20 ACAGGACTACACTCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCTGAGGACATGGCAAC
CTACTATTGCCTGCAGTATGATGAGTTCCCACTGACCTTTGGCGCCGGGACA
AAACTGGAGCTGAAGCGAACTGTGGCCGCTCCCTCCGTCTTCATTTTTCCCC
CTTCTGACGAACAGCTGAAATCAGGCACAGCCAGCGTGGTCTGTCTGCTGA
ACAATTTCTACCCTAGAGAGGCAAAAAGTGCAGTGGAAAGGTCGATAACGCCC
25 TGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGTGTGACTGAACAGGACTCAAAAGATA
GCACCTATTCCCTGTCTAGTACACTGACTCTGTCCAAGGCTGATTACGAGAA
GCACAAAGTGATGCATGCGAAGTGACACATCAGGGACTGTCAAGCCCCGT
GACTAAGTCTTTTAACCGGGGCGAATGT (SEQ ID NO: 16)

30 (3) 14C12H1L1(M)的重链可变区序列和轻链可变区序列

以 14C12H1L1 为基础对其骨架区（轻链）中个别氨基酸进行了突变得到 14C12H1L1(M)。

14C12H1L1(M)的重链可变区 14C12H1(M)：

与 14C12H1L1 的重链可变区 14C12H1 相同，即氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 9 所示。

14C12H1L1(M) 的轻链可变区 14C12L1(M)：（108 aa，基于 14C12H1L1 所做的氨基酸序列突变位点用下划线标出）

DIQMTQSPSSMSASVGDRVTFTCRASQDINTYLSWFQQKPGKSPKTL
10 IYRANRLVSGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDMATYYCLQYDEFPLTF
GAGTKLELKR（SEQ ID NO: 17）

制备例 3：双特异性抗体的序列设计

1. 序列设计

15 本发明中的双特异性抗体的结构模式属于 Morrison 模式（IgG-scFv），即在一个 IgG 抗体的两条重链的 C 端均连接另一个抗体的 scFv 片段，其重链和轻链的主要组成设计如下面的表 1。

在上述 Bevacizumab 的基础上，以上述 14C12H1L1(M)的重链可变区及轻链可变区的氨基酸序列作为 ScFv 片段部分的 VP101 抗体，称为 VP101(M)。
20 相对于 14C12H1L1，14C12H1L1(M)有效地优化了双特异性抗体的结构，提高了其有效性。

表 1：VP101(M)和 VP101(G4M)的重链和轻链的组成设计

双特异性抗体 编号	免疫球蛋白部分		连接片段	scFv 部分
	重链	轻链		
VP101(M)	Bevacizu mab-H	Bevacizumab-L	Linker1	14C12H1(M)v- Linker1-14C12L1(M)v
VP101(G4M)	Bevacizu mab-G4H	Bevacizumab-L	Linker1	14C12H1(M)v- Linker1-14C12L1(M)v

上面的表 1 中：

(1) 右下角标注“V”的，是指相应重链的可变区或者相应轻链的可变区。没有标注“V”的，相应重链或者轻链为包含恒定区的全长。这些可变区或者全长的氨基酸序列及其编码核酸序列均参照上面的制备例中记载的相应序列。

5 (2) Linker1 的氨基酸序列为：GGGGSGGGGSGGGGSG
GGGS (SEQ ID NO: 18)

可选地，氨基酸序列 GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO:19) 可作为替换前述 Linker1 的 Linker 2。

10 (3) Bevacizumab-H 其采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION:
P01857 作为重链恒定区。

(4) Bevacizumab-G4H 其采用 Ig gamma-4 chain C region, ACCESSION:
P01861.1 作为重链恒定区。

2. 抗体 VP101(M)的表达和纯化

15 分别将 VP101(M)的重链 cDNA 序列和轻链的 cDNA 序列克隆到 pUC57simple (金斯瑞公司提供) 载体中，分别获得 pUC57simple-VP101H 和 pUC57simple-VP101L 质粒。

分别将质粒 pUC57simple-VP101H 和 pUC57simple-VP101L 进行酶切 (HindIII&EcoRI)，电泳回收得到的重链轻链分别亚克隆到 pcDNA3.1 载体
20 中，提取重组质粒共转染 293F 细胞。细胞培养 7 天后，将培养液通过高速离心、上清浓缩后上样至 HiTrap MabSelect SuRe 柱，用 Elution Buffer 一步洗脱蛋白并回收目标样品抗体 VP101，并换液至 PBS。

3. 抗体 VP101(M)的检测

25 将纯化后的样品分别加入还原型蛋白电泳上样缓冲液和非还原型蛋白电泳上样缓冲液，煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳检测。

为了与制备例 4 中的突变后的抗体相区分，在本发明中亦将 VP101(M)称为 VP101(hG1WT)。上述的 VP101 (M)作为“野生型”，其采用 Ig gamma-1 chain C region, ACCESSION: P01857 作为重链恒定区，Ig kappa chain C
30 region, ACCESSION: P01834 为轻链恒定区。

VP101 (hG1WT)中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列：(453aa)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL
EWVGWINTYTGEPITYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
5 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
10 NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 20)

编码 VP101 (hG1WT)中的免疫球蛋白部分的重链的核酸序列:(1359bp)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGG
CGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAA
15 CTATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
GGGTTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
GACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACT
GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTA
CTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT
20 TGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCA
CCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCA
GCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTG
AACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTC
CATAATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCC
25 AGCGTCGTCACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
GGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCTCTGC
TCCCGAACTCCTCGGAGGCCCTAGCGTCTTCTCTTCTCCCAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTCTGT
30 CGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGT

CGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAAC
AGTACAACCTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
GCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAA
5 CCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTC
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTCGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAA
CTACAAGACCACCCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
GTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACG
10 TGTCTCTTGTTCCTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCC
AGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 21)

为了与制备例 4 中的突变后的抗体相区分,在本发明中亦将 VP101(G4M)称为 VP101(hG4WT)。上述的 VP101 (G4M)作为“野生型”,其采用 Ig gamma-4
15 chain C region, ACCESSION: P01861.1 作为重链恒定区, Ig kappa chain C region, ACCESSION: P01834 为轻链恒定区。

VP101 (hG4WT) 中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列: (450aa)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL
EWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVY
20 YCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV
PSSSLGTKITYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG
25 QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSLGK (SEQ ID NO: 22)

编码 VP101 (hG4WT) 中的免疫球蛋白部分的重链的核酸序列: (1350bp)
GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGG
30 CGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAA

CTATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
GGGTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
GACTTTAAGCGGCGGTTACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACT
GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTA
5 CTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT
TGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCA
CCAAAGGGCCCTCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCT
CCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC
GAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
10 GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAG
CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACA
CCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA
GTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCCAGCACCTGAG
TTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCC AAAACCCAAGGAC
15 ACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGG
CGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT
GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTC
20 CCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGA
CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA
25 GCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAG
TCTCTGAGCCTGTCCCTCGGCAAG (SEQ ID NO: 23)

30 制备例 4：基于人源化双特异性抗体 VP101(hG1WT)的非可变区氨基酸
突变设计

本发明人在制备例 3 所获得的 VP101(hG1WT)的基础上, 通过在其重链的第 234 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L234A), 第 235 号位点引进了亮氨酸到丙氨酸的点突变 (L235A), 获得了 VP101 (hG1DM)。

VP101(hG1DM)中的免疫球蛋白部分的重链的氨基酸序列: (453 aa, 突变位点用下划线标出)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGL
EWVGWINTYTGEPYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVY
YCAKYPHYYGSSHWYFDVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
10 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
15 QKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)

编码 VP101 (hG1DM) 中的免疫球蛋白部分的重链的核酸序列: (1359 bp, 突变位点用下划线标出)

GAGGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGGCTGGTGCAGCCAGG
CGGGTCTCTGAGGCTGAGTTGCGCCGCTTCAGGGTACACCTTCACAAA
20 CTATGGAATGAATTGGGTGCGCCAGGCACCAGGAAAGGGACTGGAGT
GGGTTCGGCTGGATCAACACTTACACCGGGGAACCTACCTATGCAGCC
GACTTTAAGCGGCGGTTCACCTTCAGCCTGGATACAAGCAAATCCACT
GCCTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGAGCTGAGGACACCGCAGTCTA
CTATTGTGCTAAATATCCCCACTACTATGGGAGCAGCCATTGGTATTT
25 TGACGTGTGGGGGCAGGGGACTCTGGTGACAGTGAGCAGCGCAAGCA
CCAAAGGGCCCAGCGTGTTTCCTCTCGCCCCCTCCTCCAAAAGCACCA
GCGGAGGAACCGCTGCTCTCGGATGTCTGGTGAAGGACTACTTCCCTG
AACCCGTCACCGTGAGCTGGAATAGCGGCGCTCTGACAAGCGGAGTC
CATACATTCCCTGCTGTGCTGCAAAGCAGCGGACTCTATTCCCTGTCC
30 AGCGTCGTACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT

CTGTAACGTCAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGT
GGAGCCCAAATCCTGCGACAAGACACACACCTGTCCCCCTGTCCTGC
TCCCGAAGCTGCTGGAGGCCCTAGCGTCTTCCTCTTTCCTCCCAAACC
CAAGGACACCCTCATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTCACCTGTGTTCGT
5 CGTGGATGTCAGCCATGAGGACCCCGAGGTGAAATTCAACTGGTATGT
CGATGGCGTCGAGGTGCACAACGCCAAAACCAAGCCCAGGGAGGAAC
AGTACAACTCCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACAGTCCTCCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAG
GCTCTCCCTGCCCCCATTGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAAGGCCAA
10 CCCAGGGAGCCCCAGGTCTATACACTGCCTCCCTCCAGGGACGAACTC
ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTTTATCCC
AGCGACATCGCCGTGAGTGGGAGTCCAACGGACAGCCCGAGAATAA
CTACAAGACCACCCTCCTGTCCTCGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCT
GTACAGCAAACCTGACCGTCGATAAATCTAGGTGGCAGCAGGGCAACG
15 TGTTCCTCTTGTTCCGTGATGCATGAAGCACTGCACAACCATTATACCC
AGAAGTCTCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG (SEQ ID NO: 25)

VP101 (hG1DM) 、VP101 (hG1WT)以及 VP101 (hG4WT)的免疫球蛋白部分的轻链氨基酸序列相同，其编码核酸序列也相同。

VP101(hG1DM)中的免疫球蛋白部分的轻链的氨基酸序列：(214 aa)

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVL
YFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFG
QGTHKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 26)

25 编码 VP101 (hG1DM) 中的免疫球蛋白部分的轻链的核酸序列：(642 bp)

GATATTCAGATGACTCAGAGCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTCTGTG
GGCGACAGGGTCACCATCACATGCAGTGCTTCACAGGATATTTCCAAC
TACCTGAATTGGTATCAGCAGAAGCCAGGAAAAGCACCCAAGGTGCTG
ATCTACTTCACTAGCTCCCTGCACTCAGGAGTGCCAAGCCGGTTCAGC
30 GGATCCGGATCTGGAACCGACTTTACTCTGACCATTCTAGTCTGCAG

CCTGAGGATTTTCGCTACATACTATTGCCAGCAGTATTCTACCGTGCCA
 TGGACATTTGGCCAGGGGACTAAAGTCGAGATCAAGCGGACCGTGGC
 CGCTCCCAGTGTCTTCATTTTTCCCCCTAGCGACGAACAGCTGAAATC
 CGGGACAGCCTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGA
 5 GGCAAAAGTGACAGTGGAAGGTCGATAACGCCCTGCAGAGTGGAATT
 CACAGGAGAGCGTGACAGAACAGGACTCCAAAGATTCTACTTATAGTC
 TGTCAAGCACACTGACTCTGAGCAAGGCTGACTACGAAAAGCATAAAG
 TGTATGCATGTGAGGTCACCCACCAGGGGCTGAGCAGTCCAGTCACCA
 AGTCATTCAACAGAGGCGAGTG C (SEQ ID NO: 27)

10

实施例 1: FcγRI 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRI 又名 (CD64) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 参与抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)。治疗性单克隆抗体与 Fc 受体结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。

15 本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRI 的亲和力常数, 以评价各抗体的 ADCC 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 FcγRI 的亲和力常数实验方法简述如下: 样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH7.4。1 μg/mL 的 FcγRIa 固定在 HIS1K 传感器上, 时间 50s, 传感器在缓冲液中平衡 60s, 固定在传感器上的 CD64 与各抗体结合, 抗体浓度为 3.12-50 nM (两倍稀释), 时间 120s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 120s。传感器使用 10mM 甘氨酸, pH1.5 再生, 时间 5s, 重复 4 次。检测温度为 30℃, 频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

25 FcγRI 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 1 和图 1—图 5 所示。

表 1: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRI 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/s)	SE(k _{dis})	R _{max} (nm)
----	--------------------	------------------------	-----------------------	------------------------	-----------------------	-----------------------

VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Bevacizumab	3.68E-09	6.61E+05	2.07E+04	2.44E-03	9.02E-05	0.46-0.49
Nivolumab	6.20E-09	6.98E+05	2.22E+04	4.32E-03	9.88E-05	0.48-0.53
VP101(hG1WT)	3.95E-09	5.67E+05	1.82E+04	2.24E-03	9.02E-05	0.68-0.80
VP101(hG4WT)	8.52E-09	6.28E+05	2.12E+04	5.35E-03	1.07E-04	0.61-0.65

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，VP101(hG1WT)可以与 Fc γ RI 结合，亲和力常数为 3.95E-09M；VP101(hG4WT)可以与 Fc γ RI 结合，亲和力常数为 8.52E-09M；Bevacizumab 可以与 Fc γ RI 结合，亲和力常数为 3.68E-09M；Nivolumab 可以与 Fc γ RI 结合，亲和力常数为 6.20E-09M；而 VP101(hG1DM)由于与 Fc γ RI 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，除 VP101(hG1DM)与 Fc γ RI 没有结合外，其他抗体与 Fc γ RI 的亲和力均相近。VP101(hG1DM)的结合活性被有效地消除。

10

实施例 2: Fc γ RIIa_H131 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

Fc 受体 Fc γ RIIa_H131 又名(CD32a_H131)可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，介导 ADCC。

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 Fc γ RIIa_H131 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 Fc γ RIIa_H131 的亲和力常数实验方法简述如下：固化物稀释液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4，分析物稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4。5 μ g/mL 的 Fc γ RIIa_H131 固定在 NTA 传感器上，固定时间为 60s，传感器在 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4 缓冲液中平衡 600s 以封闭传感器，固定在传感器上的 Fc γ RIIa_H131 与抗体结合，抗体浓度为 12.5-200 nM（两倍梯度稀释），时

间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM Glycine, pH1.7 和 10 mM 硫酸镍再生。检测温度为 30℃, 频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

5 FcγRIIa_H131 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 2 和图 6—图 10 所示。

表 2: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRIIa_H131 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/s)	SE(k _{dis})	R _{max} (nm)
VP101(hG1DM)	3.57E-08	1.15E+05	1.01E+04	4.11E-03	3.27E-04	0.41-0.53
Bevacizumab	6.44E-08	2.10E+05	1.78E+04	1.36E-02	5.14E-04	0.49-0.68
Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	2.28E-08	2.41E+05	1.48E+04	5.50E-03	3.49E-04	1.40-1.52
VP101(hG4WT)	3.68E-08	2.13E+05	2.43E+04	7.83E-03	6.65E-04	0.41-0.57

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故未能获得相应数据。

10 结果显示, VP101(hG1WT)可以与 FcγRIIa_H131 结合, 亲和力常数为 2.28E-08M; VP101(hG4WT)可以与 FcγRIIa_H131 结合, 亲和力常数为 3.68E-08M; Bevacizumab 可以与 FcγRIIa_H131 结合, 亲和力常数为 6.44E-08M; VP101(hG1DM)可以与 FcγRIIa_H131 结合, 亲和力常数为 3.57E-08M; 而 Nivolumab 由于与 FcγRIIa_H131 没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故而未能获得相应数据。

15 结果表明, 除 Nivolumab 与 FcγRIIa_H131 没有结合外, 其他抗体与 FcγRIIa_H131 均有结合, 其亲和力从强到弱依次为: VP101(hG1WT)、VP101(hG1DM)、VP101(hG4WT)、Bevacizumab。

20 实施例 3: FcγRIIa_R131 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIa_R131(又名 CD32a_R131)可与 IgG 抗体的 Fc 端结合, 介导 ADCC。

本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIa_R131 的亲和力常数,以评价各抗体的 ADCC 活性。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM) 的亲和力常数实验方法简述如下: 固化物稀释液为 PBS, 0.02%Tween-20,

5 0.1%BSA, pH7.4, 分析物稀释缓冲液为 PBS, 0.02%Tween-20, 0.02%casein, 0.1%BSA, pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIa_R131 固定在 NTA 传感器上, 固定时间为 60s, 传感器在 PBS, 0.02%Tween-20, 0.02%casein, 0.1%BSA, pH7.4 缓冲液中平衡 600s 以封闭传感器, 固定在传感器上的 FcγRIIa_R131 与抗体结合, 抗体浓度为 12.5-200 nM (两倍梯度稀释), 时间 60s, 抗体在缓冲液中解离, 时间 60s。传感器使用 10mM Glycine, pH1.7 和 10 mM 硫酸镍再生。
10 检测温度为 30℃, 频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析, 得到亲和力常数。

FcγRIIa_R131 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 3 和图 11—图 15 所示。

15 表 3: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRIIa_R131 结合的动力学参数

抗体	KD (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
VP101(hG1DM)	3.35E-08	1.20E+05	9.72E+03	4.03E-03	3.08E-04	0.57-0.69
Bevacizumab	5.16E-08	2.59E+05	1.72E+04	1.33E-02	4.52E-04	0.42-0.69
Nivolumab	6.93E-08	4.78E+05	1.09E+05	3.31E-02	2.54E-03	0.08-0.16
VP101(hG1WT)	2.42E-08	2.14E+05	1.30E+04	5.17E-03	3.28E-04	1.75-1.92
VP101(hG4WT)	3.57E-08	1.99E+05	1.23E+04	7.09E-03	3.40E-04	0.81-1.05

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低, 没有对结果进行分析, 故未能获得相应数据。

结果显示, VP101(hG1WT)可以与 FcγRIIa_R131 结合, 亲和力常数为 2.42E-08M;
20 VP101(hG4WT)可以与 FcγRIIa_R131 结合, 亲和力常数为 3.57E-08 M; Bevacizumab 可以与 FcγRIIa_R131 结合, 亲和力常数为 5.16E-08 M; Nivolumab 可以与 FcγRIIa_R131 结合, 亲和力常数为 6.93E-08 M; VP101(hG1DM)可以与

FcγRIIa_R131 结合，亲和力常数为 $3.35E-08M$ 。

结果表明，抗体与 FcγRIIa_R131 均有结合，其亲和力从强到弱依次为：VP101(hG1WT)、VP101(hG1DM)、VP101(hG4WT)、Bevacizumab、Nivolumab。

5 实施例 4: FcγRIIb 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

Fc 受体 FcγRIIb (又名 CD32b) 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，参与调控免疫细胞的功能。

本实验使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和
10 VP101(hG1DM)与 FcγRIIb 的亲和力常数，以评价 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 Fc 受体的结合能力。

Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIb 的亲和力常数实验方法简述如下：固化物稀释液为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4，分析物稀释缓冲液为 PBS，0.02%Tween-20，
15 0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 hFCGR2B-his 固定在 NTA 传感器上，固定时间为 60s，传感器在 PBS，0.02%Tween-20，0.02%casein，0.1%BSA，pH7.4 缓冲液中平衡 600s 以封闭传感器，固定在传感器上的 hFCGR2B-his 与抗体结合，抗体浓度为 12.5-200 nM (两倍梯度稀释)，时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM Glycine，pH1.7
20 和 10 mM 硫酸镍再生。检测温度为 30℃，频率为 0.6Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

实施例 5: FcγRIIIa_V158 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

25 Fc 受体 FcγRIIIa_V158 (又名 CD16a_V158)，可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，介导 ADCC 效应。

实验中使用 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_V158 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

30 Fortebio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 FcγRIIIa_V158 的亲和力

常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS, 0.02% Tween-20, 0.1% BSA, pH7.4。5 $\mu\text{g/mL}$ 的 Fc γ RIIIa_V158 固定在 HIS1K 传感器上，时间 120s，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 hFcGR3A(V158)-his 与各抗体结合，抗体浓度为 31.25-500 nM (两倍稀释)，时间 60s，抗体在缓冲液中解离，
5 时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.5 再生，时间 5s，重复 4 次。检测温度为 30℃，频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

Fc γ RIIIa_V158 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 4 和图 16—图 20 所示。

表 4: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 Fc γ RIIIa_V158 结合的动
力学参数

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/s)	SE(k _{dis})	Rmax(nm)
VP101(hG1DM)	1.34E-07	6.05E+05	2.36E+05	8.11E-02	7.42E-03	0.07-0.21
Bevacizumab	2.76E-08	5.06E+05	1.14E+05	1.39E-02	1.41E-03	0.13-0.51
Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	4.35E-08	2.39E+05	3.14E+04	1.04E-02	8.73E-04	0.80-1.22
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，VP101(hG1WT)可以与 Fc γ RIIIa_V158 结合，亲和力常数为 4.35E-08M；VP101(hG1DM)可以与 Fc γ RIIIa_V158 结合，亲和力常数为 1.34E-07M；
15 Bevacizumab 可以与 Fc γ RIIIa_V158 结合，亲和力常数为 2.76E-08M；而 Nivolumab、VP101(hG4WT)由于与 Fc γ RIIIa_V158 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，除 Nivolumab、VP101(hG4WT)与 Fc γ RIIIa_V158 没有结合外，其他抗体与 Fc γ RIIIa_V158 均有结合，其亲和力从强到弱依次为：
20 Bevacizumab、VP101(hG1WT)、VP101(hG1DM)。

实施例 6: Fc γ RIIIa_V158 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力

常数测定

Fc 受体 FcγRIIIa_F158(又名 CD16a_F158)可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，介导 ADCC。

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数，以评价各抗体的 ADCC 活性。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液为 PBS，0.02% Tween-20，0.1% BSA，pH7.4。5 μg/mL 的 FcγRIIIa_F158 固定在 HIS1K 传感器上，时间 120s，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的 hFcGR3A(F158)-his 与各抗体结合，抗体浓度为 31.25-500 nM (两倍稀释)，时间 60s，抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.5 再生，时间 5s，重复 4 次。检测温度为 30℃，频率为 0.3Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。

FcγRIIIa_F158 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 5 和图 21—图 25 所示。

表 5: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 FcγRIIIa_F158 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	SE (k _{on})	k _{dis} (1/s)	SE(k _{dis})	R _{max} (nm)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Bevacizumab	9.32E-08	2.64E+05	7.16E+04	2.46E-02	2.09E-03	0.08-0.20
Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	7.41E-08	2.47E+05	5.20E+04	1.83E-02	1.55E-03	0.15-0.48
VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，VP101(hG1WT)可以与 FcγRIIIa_F158 结合，亲和力常数为 7.41E-08M； Bevacizumab 可以与 FcγRIIIa_F158 结合，亲和力常数为 9.32E-08M；

而 Nivolumab、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)由于与 FcγRIIIa_F158 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，除 Nivolumab、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 没有结合外，其他抗体与 FcγRIIIa_F158 均有结合，其亲和力从强到弱依次为：VP101(hG1WT)、Bevacizumab。

实施例 7：C1q 与 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)的亲和力常数测定

血清补体 C1q 可与 IgG 抗体的 Fc 端结合，介导 CDC 效应。治疗性单克隆抗体与 C1q 结合的能力影响到该抗体的安全性和有效性。

本实验使用 ForteBio Octet 分子相互作用仪检测了 VP101 (hG1WT)和 VP101(hG1DM)与 C1q 的亲和力常数，以评价各抗体的 CDC 活性。

ForteBio Octet 分子相互作用仪检测相应抗体与 C1q 的亲和力常数实验方法简述如下：样品稀释缓冲液分别为 PBS，0.02%Tween-20，0.1%BSA，pH7.4。50 μg/mL 的抗体固定在 FAB2G 传感器上，固定高度约为 2.0 nm，传感器在缓冲液中平衡 60s，固定在传感器上的抗体与 C1q 结合，C1q 浓度为 0.625 nM - 10 nM（两倍稀释），时间 60s，抗原抗体在缓冲液中解离，时间 60s。传感器使用 10mM 甘氨酸，pH1.7 再生，时间 5s，重复 4 次。样品板震动速率为 1000 rpm，检测温度为 30 度，检测频率为 0.6 Hz。数据以 1:1 模型拟合分析，得到亲和力常数。数据采集软件为 ForteBio Data Acquisition 7.0，数据分析软件为 ForteBio Data Analysis 7.0。

C1q 与 VP101(hG1WT)、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)以及对照抗体 Nivolumab、Bevacizumab 的亲和力常数测定结果如表 6 和图 26—图 30 所示。

表 6: VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)抗体及其亚型与 C1q 结合的动力学参数

抗体	K _D (M)	kon(1/Ms)	SE (kon)	kdis(1/s)	SE(kdis)	Rmax(nm)
VP101(hG1DM)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Bevacizumab	1.14E-09	6.52E+06	5.64E+05	7.40E-03	5.58E-04	0.51-0.63
Nivolumab	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
VP101(hG1WT)	9.76E-10	5.73E+06	5.49E+05	5.59E-03	6.12E-04	0.32-0.51

VP101(hG4WT)	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
--------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

N/A 表示抗体与抗原没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故未能获得相应数据。

结果显示，VP101(hG1WT)可以与 C1q 结合，亲和力常数为 9.76E-10M；

Bevacizumab 可以与 C1q 结合，亲和力常数为 1.14E-09M；而 Nivolumab、

- 5 VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)由于与 C1q 没有结合或结合信号极低，没有对结果进行分析，故而未能获得相应数据。

结果表明，除 Nivolumab、VP101(hG4WT)和 VP101(hG1DM)与 FcγRIIIa_F158 没有结合外，其他抗体与 C1q 均有结合，VP101(hG1WT)与 Bevacizumab 的亲和力相近。

10

实施例 8：VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 ADCC 活性检测

- 为检测抗体 VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)在细胞水平的 ADCC 效应，发明人构建了表达有 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞，并建立了正常人 PBMC 与靶细胞共培养的体系用于检测抗体在细胞学水平的 ADCC 活性。
- 15

VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 ADCC 活性检测，方法具体如下：

- 实验首先构建了人 PD-1 过表达载体 pCDH-CMV-PD1FL-Puro (pCDH-CMV-Puro 购自优宝生物)，表达载体经病毒包装后感染 CHO-K1 细胞，用 Puromycin (2μg/mL)
- 20 加药筛选后，获得抗药性稳定表达膜 PD-1 蛋白的 CHO-K1-PD1 稳定细胞系。按 Ficoll 外周血单个核细胞分离液操作说明书分离获得正常人 PBMC，分离后的 PBMC 用 1640 完全培养基重悬，台盼蓝染色计细胞数及活率，于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中孵育过夜；次日，分别收集 CHO-K1-PD1 细胞和 PBMC，离心去上清后，用 RPMI-1640(含 1%BSA) (以下称分析培养基)重悬
- 25 细胞沉淀，离心洗涤 2 次细胞；计细胞数及活率，用分析培养基将细胞浓度调整到合适范围，根据试验设计，在 96 孔板中加入 CHO-K1-PD1 细胞悬液，30000/孔；加入 50μl 抗体，混匀室温预孵育 1h；预孵育后，加入 PBMC，90 万/50μl/孔，充分混匀；37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 4hrs。4hrs 后，取出

96 孔板，250×g 离心 5min；小心转移 100μl 细胞上清（注意不要吸到板底细胞）至新的 96 孔平底微量板中，根据 Cytotoxicity Detection Kit 说明书每孔加入 100μl 现配的反应液，室温避光孵育 30min。分别于 490nm 和 650nm 处测量 OD 值，各组 OD 值=OD_{490nm}-OD_{650nm}。根据 ADCC (%) = （实验组-阴性对照组）/（靶细胞 LDH 最大释放-靶细胞 LDH 自发释放）× 100% 计算各组 ADCC 活性。

VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 ADCC 活性检测结果用 ADCC%表示，结果如图 31 所示。

结果显示，在 PBMC 与 CHO-K1-PD1 混合培养体系中，阳性对照 14C12H1L1(G1WT)具有显著 ADCC 活性，表明 ADCC 体系正常。与同型对照抗体 hIgG1DM 相比，VP101 (hG1WT)显示出显著 ADCC 活性，且呈现剂量相关性，而 VP101(G1DM)未见 ADCC 活性。结果表明，在 VP101 (hG1WT)基础上突变产生的 VP101 (hG1DM)在细胞学水平无 ADCC 活性，ADCC 效应已消除。

15

实施例 9：VP101(hG1WT)和 VP101(hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 CDC 活性检测

为检测抗体 VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM) 在细胞学水平的 CDC 效应，发明人构建了表达有 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞（构建方法见实施例 8），并建立了靶细胞与正常人补体血清共培养的体系以检测抗体在细胞学水平的 CDC 活性。

VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 CDC 活性检测，方法具体如下：

检测当天，胰酶消化收集 CHO-K1-PD1 细胞，170×g 离心 5min 后，再用 RPMI-1640(含 1%BSA)（以下称分析培养基）重悬细胞沉淀，重复离心洗涤 2 次；计细胞数及活率，用分析培养基将细胞浓度调整到合适范围，根据试验设计，在 96 孔板中加入 CHO-K1-PD1 细胞悬液，30000/孔；加入 50μl 抗体，混匀，室温预孵育 10min；预孵育后，加入正常人补体血清（终浓度为 2%），50μL/孔，充分混匀，置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 4 小时。4 小时后，250×g 离心 5min；小心吸取 100μl 细胞上清（注意不要吸到板底细胞）并转

30

移至新的平底 96 孔板中, 根据 Cytotoxicity Detection Kit 说明书每孔加入 100 μ l 现配的反应液, 室温避光孵育 30min。分别于 490nm 和 650nm 处测量 OD 值, 各组 OD 值=OD_{490 nm}-OD_{650nm}。根据 CDC(%)=(实验组-阴性对照组)/(靶细胞 LDH 最大释放-靶细胞 LDH 自发释放) $\times$ 100%计算各组 CDC 活性。

- 5 VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)对表达 PD-1 抗原的 CHO-K1-PD1 细胞的 CDC 活性检测结果用 CDC%表示, 结果如图 32 所示。

结果显示, 在正常人补体血清与 CHO-K1-PD1 混合培养体系中, 阳性对照抗体 14C12H1L1(G1WT)与同型对照抗体 hIgG1DM 组相比, CDC%具有显著差异, 表明本 CDC 检测体系正常。而在同等剂量水平下, 与同型对照相比,
10 VP101(hG1WT)和 VP101 (hG1DM)的 CDC%均无显著性差异。

实施例 10: 外周血单核细胞与 Raji-PDL1 细胞混合培养体系 (MLR) 中检测 VP101(hG1DM)的药效学活性

实验首先构建了人 PD-L1 过表达载体 plenti6.3-PD-L1-BSD (plenti6.3-BSD 购自 invitrogen), 表达载体经病毒包装后感染 Raji 细胞, 用 BSD (10 μ g/mL) 加药筛选后,
15 获得稳定表达膜 PD-L1 蛋白的 Raji-PDL1 稳定细胞系。按 Ficoll 外周血单个核细胞分离液操作说明书分离获得正常人 PBMC, 分离后的 PBMC 用 1640 完全培养基重悬、计数、冻存。复苏 PBMC, 加入 SEB (金黄色葡萄球菌肠毒素抗原) 刺激培养两天。两天后收集对数期 Raji-PDL1 细胞, 并加入丝裂霉素 C (Sigma, 工作浓
20 度为 25 μ g/mL) 于培养箱处理 60min, 离心洗涤丝裂霉素 C 处理后的 Raji-PDL1 细胞, 同时收集并洗涤 SEB 刺激两天后的 PBMC, 在有抗体或无抗体条件下, 按照细胞数 1:1 的比例进行混合培养。3 天后, 离心收集上清, ELISA 检测上清中 IL-2 和 IFN- γ 浓度。

IFN- γ 分泌结果如图 33 所示。结果显示, VP101(hG1DM)可有效促进 IFN- γ 的分泌, 活性显著优于 Nivolumab。

- 25 IL-2 分泌结果如图 34 所示。结果显示, VP101(hG1DM)可有效促进 IL-2 的分泌, 且呈剂量依赖关系, 活性显著优于 Nivolumab。

实施例 11: VP101(hG1DM)不具有对 PD-1 表达阳性细胞的抗体介导的细胞吞噬活性

- 30 抗体介导的细胞吞噬 (antibody dependent cellular phagocytosis, ADCP) 是指结

合于细胞表面抗原的抗体的 Fc 段与具有吞噬活性的细胞如巨噬细胞的 Fc 受体结合，进而介导吞噬细胞吞噬结合了抗体的细胞。对于免疫检查点抑制剂抗体，如 PD-1 抗体而言，ADCP 活性的存在将会引起发挥抗肿瘤杀伤作用的表达有 PD-1 的免疫细胞的损伤，进而影响其抗肿瘤活性。

- 5 本实验以鼠源巨噬细胞为效应细胞，过表达 PD-1 的 CHO-K1-PD1 细胞系（构建方法见实施例 8）为靶细胞，检测其介导 ADCP 效应。本实验采用流式细胞术检测了 VP101(hG1DM)对表达有 PD-1 的细胞的 ADCP 活性，结果显示其不具备 ADCP 活性，而同靶点已上市的 PD-1 抗体 Nivolumab 具有明显的 ADCP 活性。具体方法如下：

首先在无菌条件下取 C57 小鼠（购自广东省医学实验动物中心）股骨骨髓，并经
10 红细胞裂解液冰上裂解 5min，用 DMEM 完全培养基（含 10%FBS）终止裂解，1000 rpm 离心洗涤 2 次。将细胞团用 10 mL DMEM 完全培养基重悬，并添加 M-CSF 至工作浓度为 100 ng/mL，于 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱诱导培养 7 天，其中于第 3 和第 5 天半量换液并补充 M-CSF。细胞于第 7 天诱导完成，经 0.25%胰酶消化，收集巨噬细胞，750xg 离心 5min，弃上清用 DMEM 完全培养基（含 10%FBS）悬浮并计数，
15 调整细胞密度并分装至 96 孔锥底板中，备用。

常规方法收集 CHO-K1-PD1 细胞，170xg 离心 5min，重悬后计数并测定活率，用 PBS 洗涤一次。羧基荧光素二乙酸琥珀酰亚胺酯（carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE）用 PBS 稀释至 2.5μM，取适量稀释后的 CFSE 重悬细胞（染色密度：1000 万细胞/mL），放置培养箱孵育 20min。加入 6mL 的 DMEM 完全
20 培养基（含 10%FBS）终止染色，170xg 离心 5min，弃上清；加入 1mL DMEM 完全培养基，放置培养箱孵育 10min。抗体用 DMEM 完全培养基稀释至 20μg/mL、2μg/mL、0.2μg/mL（工作浓度 10μg/mL、1μg/mL、0.1μg/mL），并设计同型对照抗体 hIgG1DM 和 hIgG4。收集新鲜诱导成熟的巨噬细胞，750xg 离心 5min，弃上清计数，转移至 96 孔锥底板中，1000xg 离心 5min，弃上清；调整 CHO-K1-PD1-CFSE 细胞密度；按实
25 验设计将稀释后的抗体分别与靶细胞按 50μL: 50μL 加至相应已含巨噬细胞的 96 孔锥底板中，重悬混匀，放置 37℃培养箱孵育 2h。每孔加 150μL 常温的 1%PBSA，1000xg 离心 5min，弃上清；用 200μL 的 PBSA 洗涤一次；按 100μL/样本将 APC anti-mouse/human CD11b antibody（用 PBSA 500 倍稀释）加至相应样本中，混匀，冰上孵育 40min。每孔加 150μL 1%PBSA，1000xg 离心 5min，弃上清；每孔用
30 200μLPBSA 洗涤一次。每孔加 200μL 1%PBSA 重悬，Beckman 流式仪上机。

上机体系中巨噬细胞为 APC+阳性，发生吞噬作用的巨噬细胞则为 APC 和 CFSE 双阳性。以双阳性细胞数与 APC 阳性细胞数比例作为吞噬率，并以此评价抗体介导的 ADCP 活性。按如下公式计算各组 ADCP 活性，以 P%表示：

$$P\% = \frac{\text{发生吞噬作用巨噬细胞细胞数}}{\text{巨噬细胞总数}} \times 100\%$$

5 结果如图 35 所示。

结果显示,Nivolumab在巨噬细胞+CHO-K1-PD1体系中具有明显的 ADCP效应；VP101(hG1DM)的吞噬率与同型对照抗体相当,表明 VP101(hG1DM)不具有 ADCP 效应。该结果表明，VP101(hG1DM)很可能具有更好的抗肿瘤效果。

10

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，本领域技术人员将会理解。根据已经公开的所有教导，可以对那些细节进行各种修改和替换，这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部范围由所附权利要求及其任何等同物给出。